

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05362

研究課題名（和文）冬虫夏草類の子実体形成と二次代謝を制御する分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism for regulation of fruiting body formation and secondary metabolism in entomopathogenic fungi

研究代表者

道羅 英夫（Dohra, Hideo）

静岡大学・理学部・教授

研究者番号：10311705

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：子囊菌類では、Velvetタンパク質VeAが二次代謝（抗生物質や毒素など、生存に必須ではない化合物の代謝）を制御していることが知られている。そこで、抗腫瘍作用を持つコルジセピンを産生するサナギタケのveA遺伝子破壊株を用いて、明暗条件下におけるトランスクリプトーム解析を行い、二次代謝におけるVeAタンパク質の機能を解析した。その結果、VeAタンパク質が光受容体の遺伝子発現を抑制することにより、光条件によってコルジセピンの生合成が制御されるという新たな光制御メカニズムが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子囊菌類ではVeAタンパク質が二次代謝が制御していることは知られていたが、本研究においてサナギタケではVeAが光受容体の発現を抑制することで二次代謝を制御するという新たな光制御メカニズムの存在が示唆された。さらに、これまでの子囊菌類の二次代謝制御機構の知見に加えて、新規の二次代謝制御に関わる候補タンパク質が見出された。これらの成果は、菌類の二次代謝制御機構の理解を深める上で重要な知見となるとともに、サナギタケが産生する抗腫瘍活性をもつコルジセピンやペプチド系有糸分裂阻害剤であるウスチロキシンの有用物質の効率的な生産方法の開発などにつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In ascomycete fungi, the velvet protein VeA is known to regulate secondary metabolism (metabolism of compounds that are not essential for survival, such as antibiotics and toxins). Therefore, the function of the VeA protein in secondary metabolism was investigated by the transcriptome analysis under light and dark conditions using a veA gene-disrupted strain of *Cordyceps militaris*, which produces the anti-tumor compound cordycepin. The results suggest a novel light-regulated secondary metabolism controlled by light conditions, in which the cordycepin biosynthesis is controlled by light conditions through the suppression of photoreceptor gene expression by the VeA protein.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：サナギタケ 二次代謝 veA遺伝子 コルジセピン ウスチロキシンの トランスクリプトーム解析 光受容体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

冬虫夏草とは、酵母やカビなどと同じ子囊菌門に属する糸状菌が昆虫に寄生して昆虫体内で増殖し、多くの担子菌類が形成するいわゆる「キノコ」と同様の子実体を形成する菌類の総称である。生殖器官である子実体には栄養体である菌糸体とは大きく異なる生理活性物質が含まれており、サナギタケの子実体は漢方薬や高級薬膳料理の食材として利用されている。そのため、人工培地やカイコ蛹を用いた子実体大量栽培技術の開発が進められているが、子実体形成のメカニズムは全く明らかになっていない。また、サナギタケは抗腫瘍作用をもつコルジセピンやペントスタチン(医薬品名コホリン)などを含有していることから、これらの生合成経路や作用機構についての研究が進められているが、他の二次代謝物の生合成系はほとんど調べられていない。冬虫夏草類と同じ子囊菌門に属する麹菌(*Aspergillus*)では、Velvetファミリータンパク質 VeA と VelB が複合体を形成して核内に移行し、有性生殖過程を制御したり、SAM 依存性メチルトランスフェラーゼ LaeA と結合してエピジェネティック制御によって、二次代謝物の生合成を制御したりしていると考えられている。しかしながら、サナギタケや申請者が単離した *Beauveria bassiana* の子実体形成株は、子囊菌でありながら、担子菌のキノコのような明確な子実体を形成し、子実体形成に光を必要とする点で *Aspergillus* とは異なっている。冬虫夏草において、子実体形成や二次代謝制御に関わる遺伝子については未だ不明な点が多く、これらの分子機構は未解明となっているのが現状である。

2. 研究の目的

冬虫夏草類は宿主昆虫に感染した後、宿主の免疫系をかいくぐって増殖し、最終的には宿主を死に至らしめて子実体を形成するという特殊な生活環をもつ。冬虫夏草類はこのような生物間相互作用を介して、さまざまな生理活性物質を産生していると考えられる。豊富な生理活性物質を含有し、鱗翅目昆虫を宿主とするサナギタケと、より広範な宿主域をもつ *B. bassiana* を用いて生物間相互作用による二次代謝の制御機構を解明することは、新たな生物間相互作用による新規の二次代謝物の発見につながる可能性がある。さらに、キノコを形成する担子菌や冬虫夏草では、子実体と菌糸体ではあたかも別の生物であるかのように異なる生理活性物質が合成されている。その中には優れた効果を示す薬効成分も存在し、チベットの高原などに生息するオオコウモリガの幼虫に寄生する冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* の子実体は、その稀少性から 1 kg で 1,000 万円以上ともいわれるほど高額で取引されている。しかしながら、大量に栽培できない子実体から生理活性物質の探索・精製を行うのは困難であり、冬虫夏草類の子実体を用いた天然物レベルでの研究は極めて少ないのが現状である。特に、子実体を形成する株が非常に稀にしか見られない *B. bassiana* では子実体に由来する生理活性物質に関する研究は皆無である。

サナギタケの高精度遺伝子モデルを構築することにより見出されたサナギタケ *veA* 遺伝子欠損株では子実体が形成されないこと、コルジセピンの産生量が減少していることから、*veA* タンパク質が子実体形成や二次代謝の制御に関わっていると考えられた。そこで、(1)冬虫夏草類の子実体形成および二次代謝に関わる遺伝子の同定、(2) *veA* 遺伝子破壊株を用いた *veA* タンパク質の機能解析、を行うことにより、子実体形成および二次代謝を制御する分子機構の解明を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

下記の(1)~(3)の実験により、冬虫夏草類の子実体形成および二次代謝に関わる *veA* タンパク質の機能解析を行うとともに、子実体形成および二次代謝に関わる他の候補遺伝子を探索し、その分子機構を明らかにする。

(1) *B. bassiana* の比較ゲノム解析による子実体形成に関わる遺伝子の探索

サナギタケの子実体形成能の有無に注目して行った比較ゲノム解析により子実体形成に関わる遺伝子の候補である *veA* 遺伝子欠損株が見出され、この方法の有効性が示された。そこで、*B. bassiana* で子実体形成できる株とできない株のゲノムシーケンスを行い、株間で比較ゲノム解析を行った。また、その過程でリピート配列に大きな違いがあることが明らかになったため、RepeatModeler を用いて *B. bassiana* ゲノム中のリピート配列のモデリングと同定を行い、RepeatMasker を用いてリピート配列の検出・比較を行った。

(2) *veA* 遺伝子破壊株の作出と遺伝子破壊が子実体形成と二次代謝に及ぼす影響

veA 遺伝子の破壊株を作出し、菌糸体の表現型や宿主への感染能・子実体形成能の変化を調べた。*veA* 遺伝子欠損株ではコルジセピン産生量が減少していたため、遺伝子破壊株でもコルジセピンを定量し、コルジセピン産生が *veA* タンパク質による制御を受けていることの再現性を確認した。

(3) *veA* 遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析による遺伝子発現の変化

veA 遺伝子破壊株を用いて明条件と暗条件で次世代シーケンサーによる RNA-seq を行い、*veA* 遺伝子の破壊によって発現量が変動する遺伝子を同定した。また、もともと *veA* 遺伝子を欠損していた株でも同様に遺伝子発現差解析を行い、*veA* 遺伝子破壊株と *veA* 遺伝子欠損株で共通して

発現変動する遺伝子を同定した。これにより、VeA タンパク質と関連性を示す遺伝子を探索するとともに、異なる光条件下における VeA タンパク質が関わる分子機構を解析した。

4. 研究成果

B. bassiana の子実体を形成する株としない株の比較ゲノム解析においては、当研究室で単離した子実体形成株 4 株のゲノムサイズは 38.9~40.2 Mb (平均 39.6 Mb) であるのに対し、子実体を形成しない株では 34.6~36.7 Mb (平均 35.4 Mb) であり、子実体形成株はゲノムサイズが平均で約 4.2 Mb 大きいことが明らかになった。このゲノムサイズの違いとなっている要因を調べたところ、子実体形成株のリピート配列は 6.4~7.17 Mb (平均 6.86 Mb) であるのに対し、子実体を形成しない株では 0.42~3.93 Mb (平均 2.28 Mb) であり、ゲノムサイズの違いはリピート配列、特に LTR 型レトロトランスポゾン の長さを反映していることが強く示唆された。子実体形成の有無とレトロトランスポゾン の関連性については今のところ不明であるが、子実体形成株が *B. bassiana* とは別種である可能性や、レトロトランスポゾン による子実体形成株のゲノム進化について、詳細な解析が必要であると考えられる。

サナギタケの *veA* 遺伝子欠損株では子実体が形成されないこと、抗腫瘍活性をもつコルジセピンの産生量と生合成遺伝子の発現量が減少していること、マイコトキシンであるウスチロキシン生合成遺伝子クラスターの遺伝子発現が低下していることを明らかにしているが、これらは元から *veA* 遺伝子を欠損していた株の性質であるため、実際に *veA* 遺伝子の欠損によるものであるかどうかは不明であった。そこで、*veA* 遺伝子破壊株を作成して、これらの性質の変化が本当に *veA* 遺伝子の欠損によるものであるかどうかを解析した。その結果、*veA* 遺伝子破壊株の菌糸の色や質感、分生子形成能などの表現型は、野生株よりも *veA* 遺伝子欠損株に近いことが示され、新たに菌糸の表現型も VeA タンパク質によって制御されている可能性が示唆された。また、*veA* 遺伝子欠損株と同様に、*veA* 遺伝子破壊株においても子実体が形成されないことが明らかになった。これらの表現型は光条件によって変化することも明らかになり、サナギタケでも VeA タンパク質の機能が光によって制御されている可能性が示唆された。また、*veA* 遺伝子破壊株のコルジセピンの定量を行ったところ、*veA* 遺伝子破壊株のコルジセピン産生パターンも、野生株より *veA* 遺伝子欠損株に近く、コルジセピン生合成も *veA* 遺伝子破壊の影響を受けていることが示された。

また、サナギタケの二次代謝における VeA の機能を明らかにするために、明条件と暗条件で *veA* 遺伝子欠損株および破壊株のトランスクリプトーム解析を行ったところ、明条件で野生型と比較して *veA* 遺伝子欠損株および破壊株の両方でコルジセピン生合成遺伝子 (図 1, *cns1-3*) の発現が上昇していることが明らかになった。コルジセピンの産生量も明条件で増加し、遺伝子発現量と相関が見られることが示された。このことから、VeA の機能は光に関連していると考えられるが、興味深いことに、恒明条件および恒暗条件において、*veA* 遺伝子破壊株では光受容体の遺伝子発現が顕著に上昇することが明らかになった (図 1, 黄色で示した 5 個の遺伝子)。これまで、子囊菌類では光によって核内への VeA の移行が阻害されることにより、二次代謝が制御されていると考えられていたが、サナギタケにおいては VeA が光受容体の遺伝子発現に対して抑制的に機能しているという新たな光条件と関連するメカニズムの存在が示唆された。さらに、*veA* 遺伝子の破壊によって遺伝子発現が上昇する遺伝子の中には、新規の Velvet タンパク質 (図 1, *VelD*) やメチルトランスフェラーゼ *LaeA* ホモログ (図 1, *LaeA homo*)、PAS ドメインタンパク質 (図 1, *PAS like protein*) などが見い出され、サナギタケにおいては、これまで知られていた子囊菌類の二次代謝制御に関わるタンパク質に加えて、光受容体や新規の Velvet タンパク質やメチルトランスフェラーゼが二次代謝制御に関わっていることが示唆された。

本研究課題において、冬虫夏草類の子実体形成や二次代謝の制御に関わる候補タンパク質を同定することができたと考えられる。これらのタンパク質の機能を解析し、冬虫夏草類の子実体形成や二次代謝の制御機構を解明することは、大量の子実体を栽培する技術や機能性物質の大量生産技術につながる可能性がある。つまり、子実体に存在する微量な新規生理活性物質の探索や機能解析の実現につながるものであり、将来的には疾病の治療や予防、健康の維持などに大きく貢献できることが期待される。

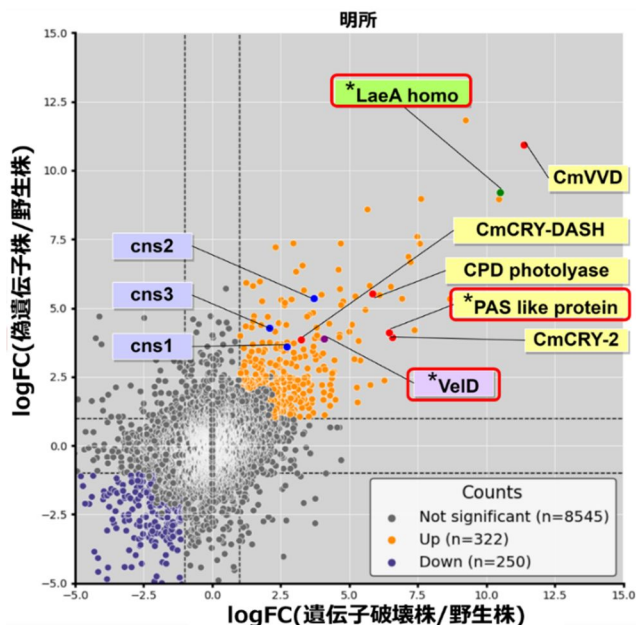


図 1. *veA* 遺伝子破壊による遺伝子発現の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 道羅英夫, 木村圭吾, 鈴木智大, 崔 宰燾, 吳 静, 河岸洋和 |
| 2. 発表標題 子実体を形成する昆虫病原性糸状菌 <i>Beauveria bassiana</i> のゲノム解析 |
| 3. 学会等名 日本きのこ学会 第25回大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 張吉麗, 小野晶子, 森井風詩, 松田里菜, 佐藤匠, 三ツ國佳祐, 崔宰燾, 河岸洋和, 道羅英夫, 鈴木智大 |
| 2. 発表標題 サナギタケのveA遺伝子破壊株の作出とその表現型の解析 |
| 3. 学会等名 日本きのこ学会 第26回大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 張吉麗, 小野晶子, 森井風詩, 松田里菜, 佐藤匠, 三ツ國佳祐, 崔宰燾, 河岸洋和, 道羅英夫, 鈴木智大 |
| 2. 発表標題 冬虫夏草サナギタケのveA遺伝子破壊株の作出とその機能解析 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 2024年度大会 |
| 4. 発表年 2024年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|